

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce
**STUDIUM KOŽNÍCH ONEMOCNĚNÍ POMOCÍ
MONOVRSTEVNÝCH LIPIDOVÝCH MODELŮ**
STUDY OF SKIN DISEASES USING MONOLAYER LIPID MODELS

Veronika Mihalová
Vedoucí práce: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

2017

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2017

Veronika Mihalová

Poděkování

Velmi děkuji své školitelce PharmDr. Barboře Školové, Ph.D. za její rady, ochotu a trpělivost při vedení této diplomové práce.

Děkuji doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a ostatním členům Skin Barrier Research Group za příjemné pracovní prostředí.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (SVV 260 401) a Grantové agentuře ČR (13-23891S).

Za podporu děkuji svým přátelům a rodině.

Obsah

1	Úvod a zadání práce	8
2	Seznam zkratk.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Kůže	10
3.1.1	Stavba kůže	10
3.1.2	Funkce kůže	11
3.2	Epidermis	12
3.2.1	Stavba epidermis.....	12
3.2.2	Lamelární tělíska.....	13
3.2.3	Stratum corneum.....	13
3.3	Ceramidy	14
3.4	Prekurzory ceramidů	15
3.5	Vybrané enzymy štěpící glukosylované ceramidy.....	15
3.5.1	Glukosylceramid sfingomyelin deacyláza	15
3.5.2	Ceramidáza	16
3.6	Onemocnění spojená s poruchou funkce ceramidázy	17
3.6.1	Nádorová onemocnění	17
3.6.2	Farberova choroba	17
3.7	Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina	19
3.7.1	Langmuirovy izotermy	21
3.7.2	Brewsterova úhlová mikroskopie	22
3.7.3	Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladu	23
4	Experimentální část	25
4.1	Chemikálie a rozpouštědla	25
4.2	Přístrojové vybavení.....	25
4.3	Příprava směsi mastných kyselin	25
4.4	Příprava lipidových směsí	26
4.5	Příprava acetátového pufru	27
4.6	Příprava Langmuirových monovrstev	27
4.6.1	Příprava monovrstev na rozhraní vzduch-kapalina	27
4.6.2	Příprava monovrstev pozorovaných Brewsterovým úhlovým mikroskopem	28

4.6.3	Příprava monovrstev na pevném podkladu.....	28
5	Výsledky a diskuze.....	29
5.1	Langmuirovy izotermy.....	29
5.2	Modul kompresibility.....	33
5.3	Hodnocení monovrstev pomocí Brewsterovy úhlové mikroskopie	35
5.4	Mikroskopie atomárních sil.....	38
6	Závěr.....	41
7	Literatura	42

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

Posluchač: Veronika Mihalová

Název diplomové práce: Studium kožních onemocnění pomocí monovrstevných lipidových modelů

Kůže je orgán chránící tělo před působením vnějších vlivů a ztrátou vody. Ochrannou funkci kůže zajišťuje nejvrchnější vrstva epidermis, *stratum corneum* (SC). Funkce této bariéry je závislá na složení a struktuře extracelulární hmoty ve SC. Hlavní složky této hmoty představují ceramidy (Cer), vyšší mastné kyseliny (VMK) a cholesterol zastoupené v téměř ekvimolárním množství. Změny ve složení mezibuněčné matrix jsou spojovány s rozvojem různých kožních onemocnění (např. atopická dermatitida).

Ceramidáza je enzym štěpící Cer a glukosylované ceramidy (prekurzory Cer) za vzniku lysosphingolipidu (LysoSph) a mastné kyseliny. Patologická aktivita tohoto enzymu vede k dysfunkci kožní bariéry a rozvoji kožních onemocnění, např. Farberovy choroby.

Cílem této práce bylo studium monovrstevných lipidových modelů, jejichž složení simuluje vysokou aktivitu ceramidázy v kůži. Lipidové modely byly studovány pomocí Langmuirových izoterm a Brewsterovy úhlové mikroskopie na rozhraní vzduch-kapalina a na pevném podkladu mikroskopii atomárních sil.

Z hodnocení monovrstev plyne, že s rostoucím zastoupením LysoSph v lipidové směsi, jež zahrnuje i růst zastoupení VMK, klesá teoretická plocha jedné molekuly lipidu v monovrstevném filmu. Strmost křivek pak naznačuje, že směsi s obsahem 2,5 – 50 % LysoSph mají větší ochotu uspořádávat se do monovrstvy než směsi s obsahem LysoSph 0, 1 a 75 %. Maximum modulu kompresibility, které naznačuje největší těsnost molekul v monovrstvě, bylo zjištěno u vzorku s 10% zastoupením LysoSph. Mikroskopie atomárních sil odhalila, že vysoké zastoupení LysoSph (50 a 75 %) způsobuje snížení homogenity monovrstvy.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

Student: Veronika Mihalová

Title of Thesis: Study of skin diseases using monolayer lipid models

Skin is an organ that protects the body against external influences and excessive water loss. The proper skin barrier is localized in the outermost layer of the epidermis, the stratum corneum (SC). The function of this barrier depends on the composition and organization of the extracellular space of SC. It consists mainly of ceramides (CER), free fatty acids and cholesterol in approximately equimolar ratio. Imbalances in the lipid composition are associated with skin diseases such as atopic dermatitis.

Ceramidase is an enzyme which cleaves CER or glucosylated ceramides (precursor of CER) to lysosphingolipid (LysoSph) and fatty acid. Abundance or deficit of this enzyme causes dysfunction of skin barrier and the manifestation of skin diseases, e.g. Farber's disease.

The aim of this work was to study the monolayer lipid models whose compositions reflect the abundance of ceramidase in the skin. Lipid models were studied by Langmuir monolayers at the air-liquid interface and at the solid surface, including Brewster angle microscopy and atomic force microscopy.

With increasing addition of LysoSph (0 - 75%) – including increasing addition of free fatty acids, the theoretical area per molecule of the lipid is decreasing. The curve steepness indicates, that mixtures containing 2,5 – 50 % of LysoSph condense spontaneously on the air-liquid interface compare to mixtures with 0, 1 and 75% addition of LysoSph. The maximum of the modulus of compressibility (showing the tightness of molecules in monolayer) was found in mixture containing 10 % addition of LysoSph. Atomic force microscopy proved, that high content of LysoSph (50 and 75 %) causes a decrease in monolayer homogeneity.

1 Úvod a zadání práce

Kůže je životně důležitý orgán, který zabraňuje poškození organismu v důsledku ztráty vody a působení nepříznivých vnějších vlivů. Tuto ochrannou funkci kůže zajišťuje nejsvrchnější vrstva epidermis nazývaná *stratum corneum* (SC). Bariérová funkce kůže je závislá na složení a struktuře extracelulární hmoty této vrstvy. Dominantní složky této hmoty tvoří ceramidy (Cer), cholesterol a vyšší mastné kyseliny. Cer jsou syntetizovány hydrolytickým štěpením svých prekurzorů, glukosylovaných ceramidů (GCer).

Ceramidáza je enzym katalyzující rozklad Cer a GCer. Štěpením Cer vzniká sfingosin (Sph) a mastná kyselina, štěpením GCer lysosfingolipid (LysoSph) a mastná kyselina. Vysoká aktivita tohoto enzymu vede k hromadění LysoSph, zvyšování množství mastných kyselin a úbytku Cer ve SC oproti fyziologickému stavu. Tato změna ve složení extracelulární hmoty je podkladem pro rozvoj kožních onemocnění.

Cílem této práce bylo hodnocení vlivu LysoSph na strukturu a vlastnosti lipidů SC za použití monovrstevných modelů. Lipidové modely byly studovány pomocí Langmuirových izoterm a Brewsterovy úhlové mikroskopie na rozhraní vzduch-kapalina a na pevné fázi mikroskopií atomárních sil.

2 Seznam zkratek

Cer	ceramidy
CERáza	ceramidáza
GCer	glukosylované ceramidy
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
LysoSph	lysosfingosin
SC	stratum corneum
Sph	sřingosin
VMK	vyšří mastné kyseliny

3 Teoretická část

3.1 Kůže

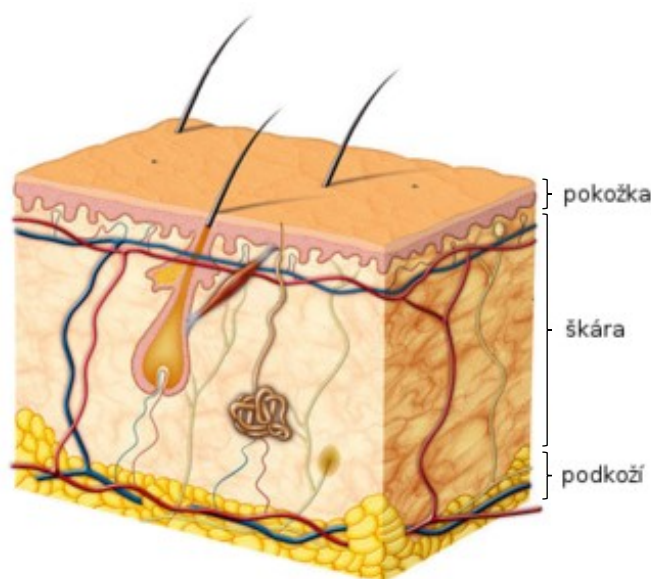
3.1.1 Stavba kůže

Kůže je orgán tvořící povrch těla suchozemských obratlovců. Její plocha se odvíjí od velikosti jedince. U dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 1,6 – 2 m², což z kůže činí největší orgán lidského těla. Váha dosahuje 4,3 – 5 kg. Z anatomického hlediska můžeme kůži rozdělit do tří základních vrstev: pokožka, škára a podkožní vazivo (*obr. 1*).^{1,2}

Zevní vrstvu kůže představuje pokožka (*epidermis*), kterou tvoří vícevrstevný dlaždicový epitel na povrchu rohovatějící. Právě tento epitel představuje bariéru chránící organismus před vnějšími vlivy.^{1,3}

Střední vrstva kůže se nazývá škára (*corium*). Jedná se o vazivovou vrstvu obsahující elastická a kolagenní vlákna, která propůjčují kůži mechanickou pevnost a činí ji pružnou. Nachází se zde množství cév a senzorických zakončení.^{1,3}

Nejhlubší vrstvou je podkožní vazivo (*tela subcutanea*), které pojí kůži k okolním tkáním. Jeho součástí jsou tukové buňky, které mohou tvořit až několikacentimetrovou vrstvu.^{1,3}



Obr. 1 Anatomie kůže.⁴

3.1.2 Funkce kůže

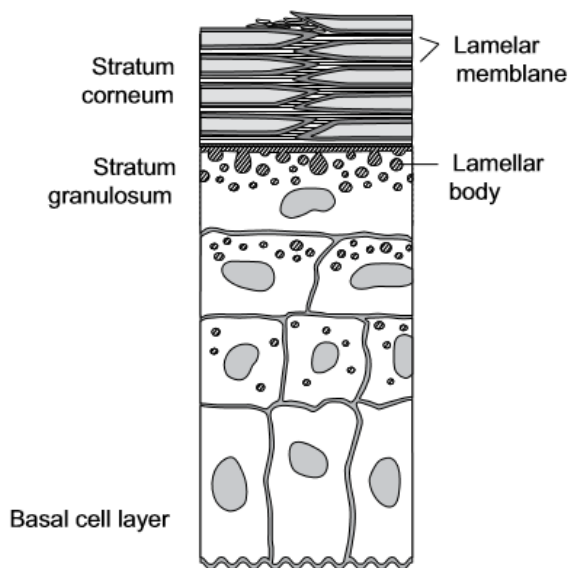
Kůže je životně důležitý orgán suchozemských obratlovců zajišťující řadu funkcí. Představuje ochrannou bariéru, která omezuje průnik škodlivin do organismu. Zabraňuje poškození, které je způsobeno mechanickým namáháním, činností mikroorganismů nebo působením chemických látek a ultrafialového záření. Současně se podílí na udržení homeostázy vnitřního prostředí tím, že brání ztrátám vody. Účastní se termoregulace, vykazuje metabolickou a vylučovací aktivitu. Je orgánem hmatu.^{1, 3}

3.2 Epidermis

3.2.1 Stavba epidermis

Epidermis je tvořena pěti vrstvami: nejhlubší *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a nejsvrchnější *stratum corneum* (SC). Ve *stratum basale* se mitoticky dělí buňky zvané keratinocyty. Nově vznikající buňky posouvají stávající buňky směrem k povrchu epidermis. Buňky prostupují všemi vrstvami epidermis, až se nakonec na samém povrchu odloupnou (*Obr. 2*).^{1, 5, 6}

Během tohoto pohybu dochází k terminální diferenciaci, během níž keratinocyty ztrácejí jádro, postupně se oplošťují a rohovatí. Zcela diferencované keratinocyty nazýváme korneocyty.^{1, 5, 6}



Obr. 2 Vývoj buněk epidermis.⁷

3.2.2 Lamelární tělíska

V dolní části stratum spinosum se začínají v keratinocytech tvořit tzv. lamelární tělíska. Jedná se o sekreční orgány ovoidního tvaru, které vznikají v Golgiho aparátu.^{5, 8}

Obsah lamelárních tělísek tvoří především látky lipidové povahy, zejména cholesterol (Chol), fosfolipidy a prekurzory ceramidů: glukosylované ceramidy (GCer) a sfingomyelin. Kromě těchto látek se zde vyskytují i hydrolytické enzymy schopné prekurzory rozkládat.^{5, 6}

Na hranici mezi stratum granulosum a SC dochází k exocytóze tělísek a uvolnění jejich obsahu do mezibuněčného prostoru SC. Zde probíhá samotné štěpení prekurzorů.^{5, 6}

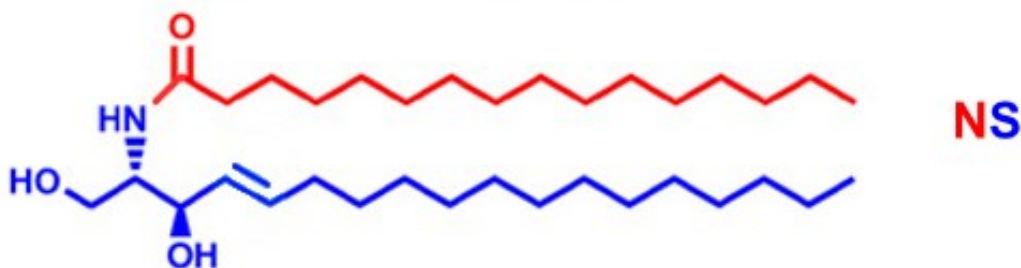
3.2.3 Stratum corneum

Na povrchu epidermis se rozkládá SC. Právě tato vrstva zajišťuje ochrannou funkci kůže. Je utvářena korneocyty zasazenými do lamel mezibuněčné lipidové hmoty. Hlavní složky této hmoty představují ceramidy (Cer), Chol a vyšší mastné kyseliny (VMK) zastoupené v téměř ekvimolárním množství. V malém množství obsahuje lipidová hmota cholesterol-sulfát (CholS) a volné sfingoidní báze. Změny ve složení mezibuněčné matrix jsou spojovány s rozvojem různých kožních onemocnění (např. atopická dermatitida).^{6, 7, 9}

Z důvodu přítomnosti VMK je pH vnější části SC mírně kyselé. Za fyziologických podmínek se pohybuje v rozmezí 5,0 až 5,5.⁵

3.3 Ceramidy

Z chemického hlediska se Cer řadí do skupiny sfingolipidů. Jejich molekula obsahuje mastnou kyselinu a sfingoidní bázi, které jsou k sobě vázány amidovou vazbou. K nejhojněji zastoupeným sfingoidním bazím epidermálních Cer patří sfingosin (Sph), aminoalkohol s osmnácti uhlíkatým řetězcem. Mastné kyseliny vázané na Cer mohou obsahovat různě dlouhý řetězec s rozmanitým stupněm nasycení a hydroxylace. Mastné kyseliny vázané v epidermálních Cer běžně obsahují nehydroxylované, α -hydroxylované a ω -hydroxylované řetězce o délce 16 až 32 uhlíků. Za zástupce epidermálních Cer můžeme tedy považovat N-nonhydroxyacylovaný Sph neboli Cer NS (*Obr. 3*).^{7,9}



Obr. 3 ***Strukturní vzorec NS ceramidu.***

Cer jsou součástí plazmatických membrán eukaryotních buněk. Kromě stavební funkce hrají důležitou roli v procesu programované buněčné smrti, autofagie, buněčné diferenciaci, intercelulární adheze a mnoha dalších. V lidském těle jsou hojně zastoupeny především ve SC.⁹

s akutními projevy atopické dermatitidy byla prokázána pětikrát vyšší aktivita tohoto enzymu v porovnání se zdravými osobami.¹³

3.5.2 Ceramidáza

Ceramidáza (CERáza) je enzym katalyzující hydrolytické štěpení amidové vazby Cer. Tímto rozkladem tedy vzniká VMK a Sph. V současnosti je známo 5 typů lidských CERáz. Dle optimálního pH jejich aktivity je rozdělujeme na kyselou CERázu, neutrální CERázu, zásaditou CERázu 1, zásaditou CERázu 2 a zásaditou CERázu 3.¹⁴

3.5.2.1 Kyselá ceramidáza

Optimální pH pro aktivitu kyselé CERázy je 4,5. Tento enzym je přítomen téměř ve všech buňkách lidského těla, především v buňkách srdce a ledvin.¹⁴

Bylo zjištěno, že tento typ CERázy katalyzuje rozklad nejen Cer, ale i GCer. Při hydrolýze GCer vzniká LysoSph, konkrétně glukosylovaný Sph.^{15, 16}

3.5.2.2 Neutrální ceramidáza

Neutrální CERáza má vysoké zastoupení především v tkáních tenkého a tlustého střeva, konkrétně v buňkách kartáčového lemu. Bylo zjištěno, že zde slouží mimo jiné i jako regulátor buněčného přežití nádorových buněk tumoru tlustého střeva. Inhibice neutrální CERázy zpomaluje růst tumoru v důsledku nárůstu hladiny ceramidů.¹⁴

3.5.2.3 Zásaditá ceramidáza 1, 2 a 3

Tyto enzymy mají optimální pH pro svou aktivitu přibližně 8. K vysoké expresi zásadité CERázy 1 dochází především v epidermálních keratinocytech, kde zodpovídají za kožní homeostázu. Zásaditá CERáza 2 a 3 se hojně nachází v tkáni placenty, kde hrají roli v procesu apoptózy a buněčné proliferace.¹⁴

3.6 Onemocnění spojená s poruchou funkce CERázy

3.6.1 Nádorová onemocnění

Abnormální aktivita kyselé CERázy byla pozorována u řady nádorových tkání. Vysoká aktivita tohoto enzymu a současně nízká hladina Cer byla zaznamenána například u adenokarcinomu tlustého střeva či rakoviny prostaty. Inhibice kyselé CERázy by mohla být do budoucna využívána v terapii těchto onemocnění.^{14, 15}

3.6.2 Farberova choroba

Farberova choroba neboli Farberova lipogranulomatóza je velmi vzácné, dědičné onemocnění. Je charakterizováno mutací genu, který kóduje kyselou CERázu. Následkem této mutace dochází k poklesu degradace Cer, a tudíž jejich kumulaci v tkáních.^{14, 15, 17, 18}

Typický klinický obraz zahrnuje bolest kloubů, jejich ztuhlost a deformace, které jsou způsobené přítomností lipogranulomatózních lézí (*Obr. 5*). Tyto léze jsou zpravidla patrné i v podkoží. Jejich výskyt v hrtanu zapříčiňuje typický chrapot. V pokročilém stadiu onemocnění mohou být zasaženy tkáně srdce, plic či nervové soustavy.^{14, 15, 17}

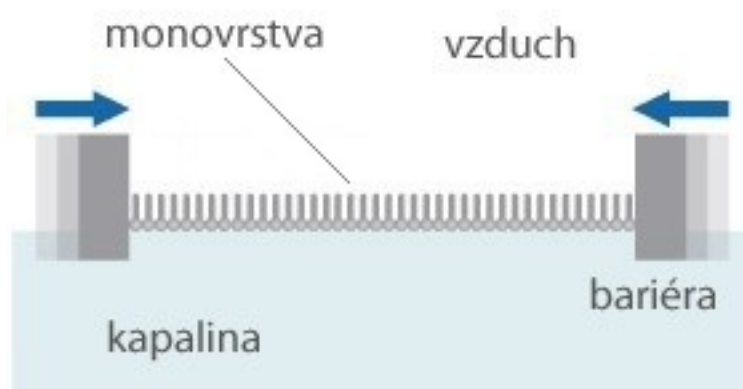


Obr. 5 Celkový pohled na pacienta s Farberovou chorobou.¹⁹

Závažnost onemocnění a rychlost manifestace je variabilní. Nejtěžší případy představují novorozenci s těžkým postižením nervové soustavy, kteří umírají již několik dní po narození. V nejméně závažných případech zůstává nervová soustava nedotčena a pacienti umírají ve věku rané dospělosti. Ačkoli se uvažuje o léčbě pomocí genové terapie či transplantace kostní dřeně, pro Farberovu chorobu v současnosti neexistuje efektivní léčba.^{14, 15, 17}

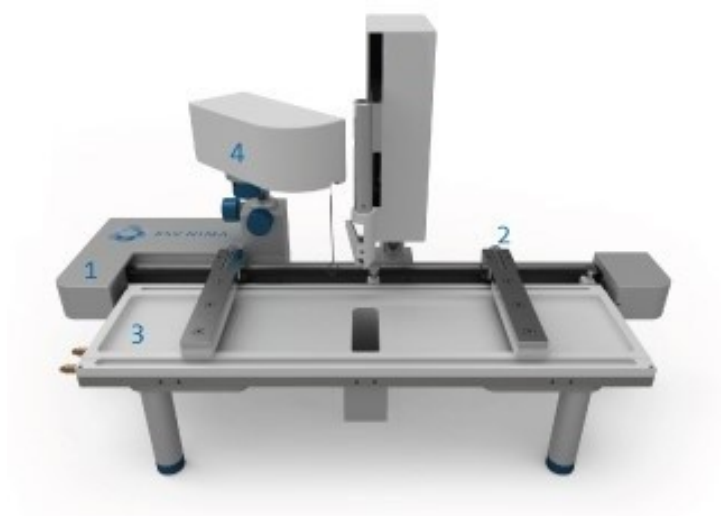
3.7 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina

Tato technika umožňuje pozorování lipidů ve formě monovrstevného filmu, který se rozprostírá na rozhraní dvou fází. Dolní fázi tvoří polární kapalina, která je nazývána jako subfáze. Horní fáze je vzduch. Amfifilní molekuly, které se nerozpouští v kapalné fázi, se na jejich rozhraní orientují na základě polarity. Polární část molekuly směřuje do polární subfáze. Nepolární část molekuly je orientována směrem do vzduchu (*Obr. 6*).^{20, 21, 22}



Obr. 6 Langmuirova monovrstva na rozhraní vzduch-kapalina.²³

Aparát pro studium Langmuirových monovrstev na rozhraní vzduch-kapalina tvoří vana z hydrofobního materiálu, ve které se nachází polární kapalina temperovaná na požadovanou teplotu. Na její hladinu se opatrně nanáší amfifilní molekuly. Monovrstva je následně stlačována za pomoci pohybu bariér, které jsou umístěny na bocích soustavy. Stlačováním monovrstvy dochází ke změnám povrchového tlaku. Tyto změny jsou zaznamenávány pomocí senzoru. Senzorem je platinový plíšek (tzv. Wilhelмова destička) částečně ponořený do subfáze (*Obr. 7*).^{20, 21}



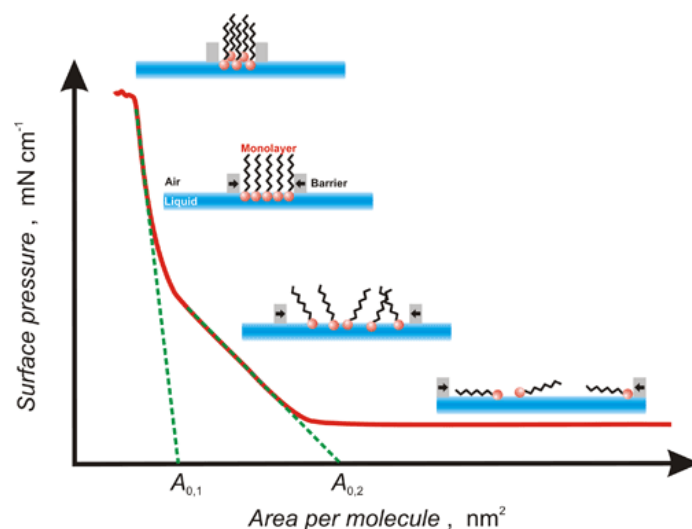
Obr. 7 Aparát pro přípravu monovrstev.²³

1 – rám, 2 – bariéra, 3 – vana, 4 – závěsné zařízení pro senzor povrchového tlaku

3.7.1 Langmuirovy izotermy

Chování monovrstvy popisuje izoterma neboli graf závislosti povrchového napětí na ploše jedné molekuly.²⁰ Plocha jedné molekuly je teoretická hodnota udávající plochu, kterou v monovrstvě zaujímá právě jedna molekula. Tato hodnota je počítána softwarem na základě koncentrace (resp. množství) a molekulové hmotnosti zkoumaných látek.

Přibližováním bariér dochází k těsnějšímu uspořádání molekul a formování monovrstvy. Dochází ke strukturálním změnám monovrstvy, které mají vliv na tvar křivky.^{20, 22} Z průběhu izotermy lze rozeznat základní fázové změny: gas, liquid-expanded, liquid-condensed a solid (*Obr. 7*).^{20, 22} Vlivem komprese se zmenšuje plocha jedné molekuly a narůstá povrchový tlak. Průběh křivky vypovídá o ochotě molekul uspořádat se do monovrstvy. Strmější průběh křivky naznačuje vyšší ochotu k uspořádání.

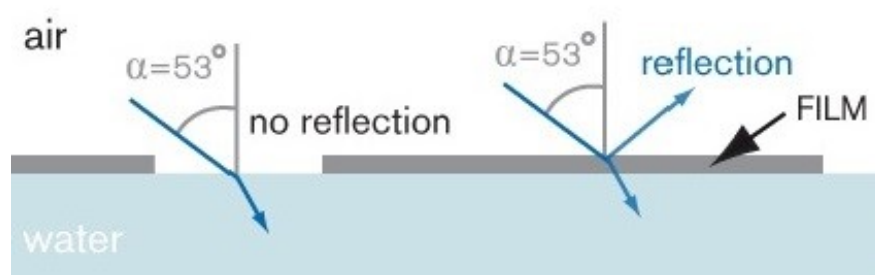


Obr. 7 Izoterma.²⁴ Graf závislosti povrchového napětí (*Surface pressure*) na ploše jedné molekuly (*Area per molecule*).

Pro studium monovrstev se dále využívá tzv. modul kompresibility. Jedná se o převrácenou hodnotu kompresibility. Je ukazatelem elasticity. Modul kompresibility se vypočítá derivací izotermy.^{20, 25}

3.7.2 Brewsterova úhlová mikroskopie

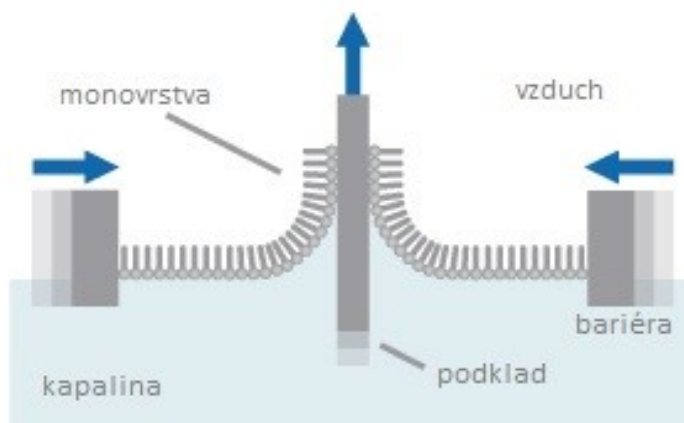
Tato metoda je založena na principu reflexní spektroskopie. Paprsek polarizovaného světla, který dopadá na povrch kapaliny pod tzv. Brewsterovým úhlem (přibližně 53°), se neodráží. Pokud se na hladině nachází monovrstva, dochází k odrazu paprsku (Obr. 8). Odražený paprsek je detekován a zpracován do podoby dvourozměrného snímku. Lipidové domény jsou na snímku znázorněny jako světlejší oblasti.^{20, 23, 26}



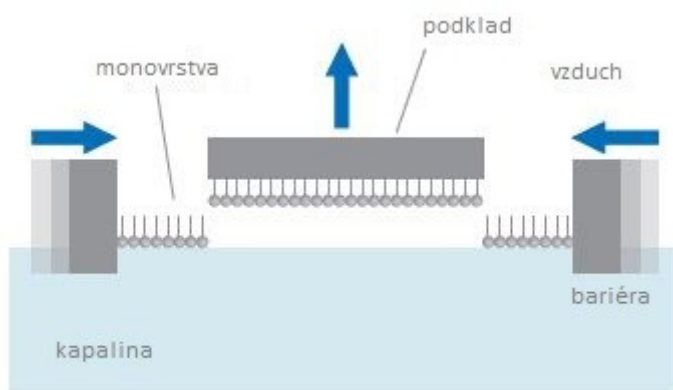
Obr. 8 Princip Brewsterova úhlového mikroskopu.²⁷ Paprsek dopadající na rozhraní vzduch-voda pod úhlem 53° se od hladiny kapaliny neodráží (levá část). Odrážení paprsku v přítomnosti monovrstevného filmu (pravá část).

3.7.3 Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladu

Plovoucí monovrstva může být prostřednictvím vhodných technik přenesena na pevný podklad. Přenos je možné uskutečnit dvěma základními způsoby. Prvním způsobem je tzv. Langmuir-Blodgett metoda. Tato metoda umožňuje fixaci monovrstvy k povrchu, která se uskutečňuje vertikálním průchodem vhodného materiálu skrz plovoucí monovrstvu (*Obr. 9*). Pro monovrstvy rigidnější povahy je vhodnější metoda Langmuir-Schaefer. V tomto případě se přenos uskutečňuje horizontálním přiložením hydrofobního podkladu k monovrstvě (*Obr. 10*).^{20, 23}



Obr. 9 Langmuir-Blodgett metoda.²³



Obr. 10 Langmuir-Schaefer metoda.²³

Pro zdárné uložení monovrstvy na pevný podklad je nezbytné provádět přenos za konstantní komprese, zpravidla při povrchovém tlaku 20 - 40 mN/m. Tento tlak zajišťuje dostatečnou soudržnost monovrstvy a předchází jejímu rozpadu v procesu přenosu. Typ pevného podkladu je volen s ohledem na použitou metodu a další manipulaci s monovrstvou. Běžně se používají podklady ze skla nebo silikonu.^{20, 23}

Monovrstva přenesená na pevný podklad může být následně zkoumána dalšími metodami, jako je mikroskopie atomárních sil, rentgenová difrakce nebo infračervená spektroskopie.²⁰ Tyto metody nám umožňují detailnější popis chování monovrstev.

3.7.3.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil umožňuje trojrozměrné zobrazení monovrstvy v molekulárním rozlišení. Podmínkou použití této techniky je fixace monovrstvy na pevný podklad. Povrch monovrstvy je systematicky snímán za pomoci sondy, která se pohybuje v těsné blízkosti jejího povrchu. Principem metody je detekce sil působících mezi sondou a povrchem.^{20, 28}

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a rozpouštědla

N-lignoceroylsfinhosin (NS ceramid) a glukosylovaný sfinhosin (LysoSph) byly pořízeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Ostatní chemikálie a rozpouštědla v kvalitě pro HPLC byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Ultračistá voda byla připravena systémem Milipore Q.

4.2 Přístrojové vybavení

Pro přípravu Langmuirových monovrstev a jejich pozorování Brewsterovým úhlovým mikroskopem byla použita vana KN NIMA 1003 (medium) KSV NIMA, mikroskop KSV NIMA MicroBAM a software KSV NIMA.

Pro přípravu Langmuirových monovrstev na pevném podkladu metodou Langmuir-Blodgett byla použita vana KN 2001 (small) KSV NIMA a software KSV NIMA.

Mikroskopie atomárních sil byla provedena pomocí zařízení VEECO CP II, kontaktní mód využívající sondu CONT20A-CP Si a software Veeco DI SPMLab NT 6.0.2.

Statistické zpracování dat bylo provedeno testem one-way (jednofaktorová) ANOVA. Výsledky jsou uváděny jako průměry \pm SEM (střední chyba průměru).

4.3 Příprava směsi mastných kyselin

K přípravě lipidových směsí byla použita směs VMK. Tuto směs tvoří kyselina palmitová (1,8 % z celkového látkového množství mastných kyselin), kyselina stearová (4 %), kyselina arachidonová (7,6 %), kyselina behenová (47,8 %) a kyselina lignocerová (38,8 %). Toto složení odpovídá zastoupení VMK ve SC.²⁹

Jednotlivé kyseliny byly rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) a následně smíseny v poměru uvedeném výše. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno dusíkem. Směs VMK byla zbavena zbytkového množství rozpouštědla pomocí

vakuového exsikátoru s obsahem tuhého parafínu a oxidu fosforečného jakožto vysoušedel.

4.4 Příprava lipidových směsí

Zkoumané lipidové směsi obsahovaly Cer, LysoSph, směs VMK, Chol a CholS. Byla připravena ekvimolární směs Cer, VMK a Chol, k níž bylo přidáno 5 % (w/w) CholS. Tato směs je kontrolní a prezentuje fyziologické složení lipidů SC. V ostatních lipidových směsích bylo určité molární množství Cer nahrazeno ekvimolární směsí LysoSph a VMK (*Tab. 1*). Složení těchto směsí simuluje nárůst aktivity enzymů štěpících amidovou vazbu GCer.

Tab. 1 Složení lipidových směsí.

Poměr Cer a LysoSph ve směsích [%]		Množství jednotlivých lipidů ve směsích [μg]				
Cer	LysoSph	Cer	LysoSph	VMK	Chol	CholS
100	0	223,4	0	118,7	132,9	25,0
99	1	221,2	1,6	119,9	132,9	25,0
97,5	2,5	217,8	4,0	121,7	132,9	25,0
95	5	212,2	7,9	124,7	132,9	25,0
90	10	201,1	15,9	130,6	132,9	25,0
75	25	167,6	39,7	148,4	132,9	25,0
50	50	111,7	79,3	178,1	132,9	25,0
25	75	55,9	119,0	207,8	132,9	25,0

Cer, Chol a směs VMK byly rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v). LysoSph a CholS byly rozpuštěny v methanolu. Pomocí mikropipety byla odebrána přesná množství jednotlivých roztoků, která byla následně smísena ve vialkách. Po důkladem smísení všech složek byla rozpouštědla odpařena dusíkem a zbytkové množství rozpouštědel odstraněno pomocí vakuového exsikátoru s obsahem tuhého parafínu a oxidu fosforečného jakožto vysoušedel. Takto připravené lipidové směsi byly uchovávány v mrazáku. Před měřením byly rozpuštěním ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) převedeny do roztoku o koncentraci 1 mg/ml.

4.5 Příprava acetátového pufru

Subfázi Langmuirových monovrstev tvořil acetátový pufr (5 mM, pH 5). Byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství octanu amonného v ultračisté vodě. Hodnota pH byla překontrolována pH metrem se skleněnou elektrodou a případné odchylky této hodnoty byly upraveny kyselinou octovou nebo roztokem amoniaku. Následně byl pufr přefiltrován.

4.6 Příprava Langmuirových monovrstev

4.6.1 Příprava monovrstev na rozhraní vzduch-kapalina

Do důkladně vyčištěné a osušené vany (KN 1003; medium) byl nalit připravený acetátový pufr. Následně byly na okraje vany nasazeny bariéry. Do kapaliny bylo umístěno teplotní čidlo a senzor pro měření povrchového tlaku.

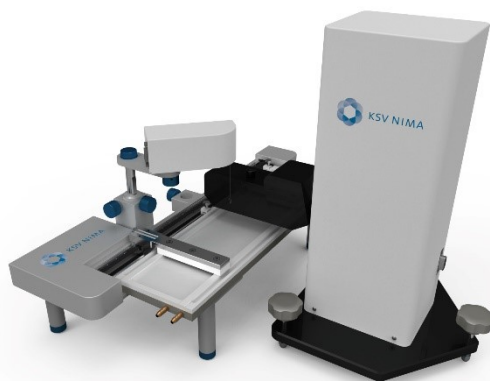
Následovalo čištění hladiny subfáze. Toto čištění se provádí několikrát (zhruba třikrát), a to přibližováním bariér k sobě a odstraňováním nečistot, které na bariérách ulpěly, za pomoci pipety.

Po vytemperování subfáze na 32 °C bylo na její hladinu naneseno 30 μ l roztoku lipidové směsi. Nanesení se provádí opatrným, rovnoměrným rozmísťováním kapek roztoku mikrostříkačkou. Po uplynutí 15 minut, během nichž se odpařilo rozpouštědlo, bylo provedeno měření. Rychlost pohybu bariér činila 20 mm/min. Maximální hodnota povrchového tlaku byla nastavena na 50 mN/m.

Po ukončení měření byly vana, teplotní čidlo a senzor důkladně omyty směsí chloroform:methanol (3:1, v/v). K čištění bariér byl použit methanol. Měření každé lipidové směsi bylo provedeno nejméně šestkrát.

4.6.2 Příprava monovrstev pozorovaných Brewsterovým úhlovým mikroskopem

Příprava probíhala obdobně jako u výše uvedeného postupu, ovšem před nalitím pufru byla přibližně do středu vany umístěna odrazová destička. Těsně před samotným měřením byl nad tuto destičku umístěn Brewsterův úhlový mikroskop (*Obr. 11*). Pozorování bylo provedeno při rychlosti pohybu bariér 20 mm/min.



Obr. 11 Zařízení pro pozorování Langmuirových monovrstev Brewsterovým úhlovým mikroskopem.³⁰

4.6.3 Příprava monovrstev na pevném podkladu

Langmuirové monovrstvy byly přeneseny na pevný podklad pomocí Langmuir-Blodgett metody. Přenos byl prováděn ve vaně KN 2001 (small).

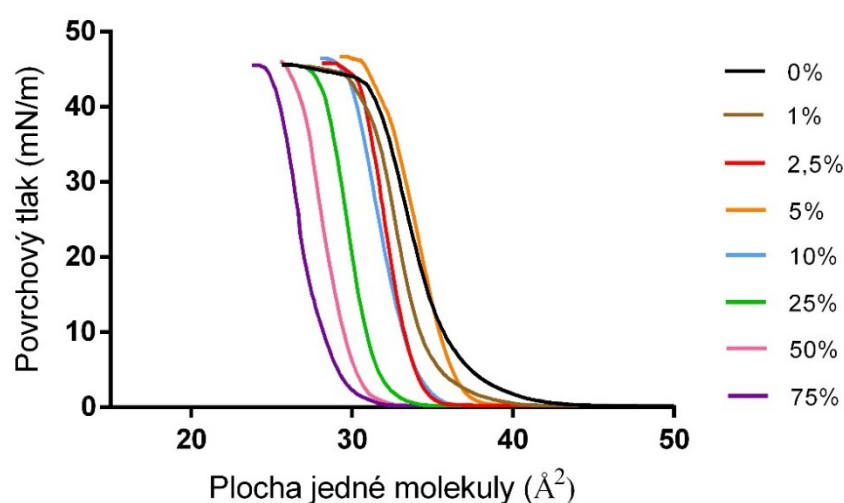
Do držáku nad vanou bylo umístěno čerstvě odloupnuté slídové sklíčko o velikosti 15×15 mm. Toto sklíčko bylo následně ponořeno do subfáze. Po nanesení roztoku lipidové směsi a odpaření rozpouštědla bylo za konstantního povrchového tlaku 20 mN/m provedeno vytažení sklíčka. Rychlost tohoto pohybu činila 2 mm/min. Sklíčko bylo následně uloženo do vialky a uchováno pod argonem do doby provedení hodnocení pomocí mikroskopie atomárních sil. Přenos monovrstvy na pevný podklad byl u každé lipidové směsi proveden nejméně třikrát.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Langmuirovy izotermy

Tab. 2 Poměr LysoSph/Cer v lipidových směsích.

Lyso-Sph	0 %	1 %	2,5 %	5 %	10 %	25 %	50 %	75 %
Cer	100 %	99 %	97,5 %	95 %	90 %	75 %	50 %	25 %

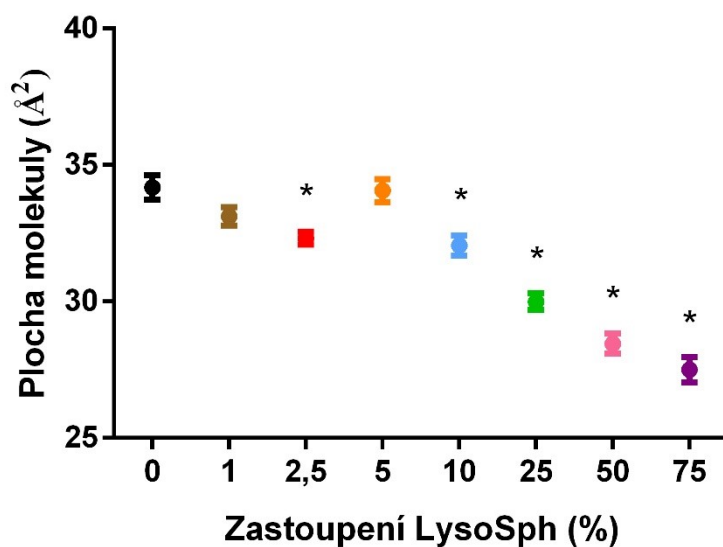


Graf 1 Izotermy.

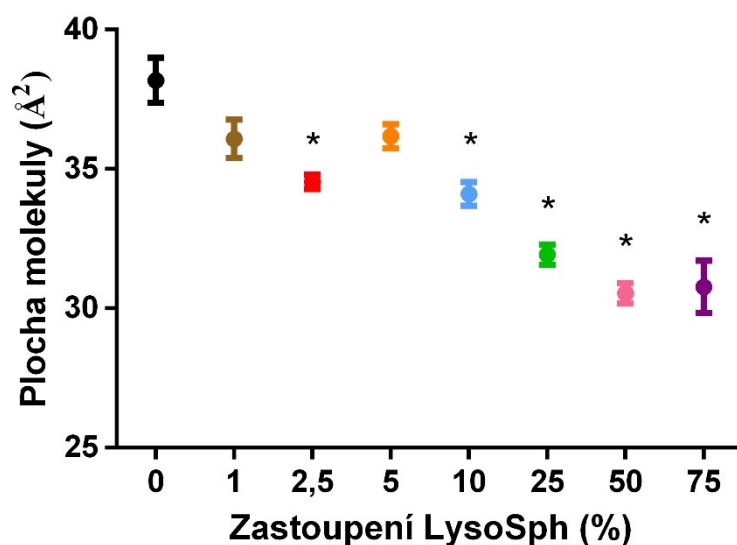
Graf 1 zobrazuje izotermy všech zkoumaných lipidových směsí. Jsou od sebe navzájem barevně odlišeny podle zastoupení lysoSph ve směsi. Poměr LysoSph a Cer jednotlivých směsí je uveden v *tabulce 2*. Směs s nulovým zastoupením LysoSph obsahuje ekvimolární množství Cer, VMK a Chol s přídavkem 5 % (w/w) CholS. Toto složení napodobuje fyziologické složení lipidů SC a slouží ke srovnání.

Z *grafu 1* je patrné, že nejstrmější nárůst křivky mají směsi se zastoupením LysoSph 2,5 – 50 %. Tato skutečnost naznačuje, že lipidy těchto směsí se uspořádávají do monovrstvy ochotněji než lipidy směsí se zastoupením LysoSph 0, 1 a 75 %. Nejméně strmý průběh vykazuje izoterma směsi s nulovým obsahem LysoSph. Tato směs sama o sobě vykazuje ochotu k uspořádávání do monovrstvy.³¹ Přídavek LysoSph tuto vlastnost podporuje.

V minulosti byla provedena studie, jež zkoumala vliv GCer na strukturu a uspořádání monovrstevných modelů kůže. Její výsledky naznačují, že s přidavkem GCer ochota k uspořádání do monovrstvy klesá.³² LysoSph má tedy odlišný vliv na ochotu k uspořádání lipidů do monovrstvy než GCer. Tato skutečnost by mohla mít souvislost s rozdílnými fyzikálně chemickými vlastnostmi LysoSph a GCer. LysoSph vykazuje oproti GCer vyšší rozpustnost ve vodě.³³



Graf 2 Graf znázorňuje hodnoty plochy jedné molekuly jednotlivých lipidových směsí při povrchovém tlaku 20 mN/m. Symbol * značí statisticky významný rozdíl oproti hodnotě, která byla naměřena u směsi se zastoupením LysoSph 0 %.



Graf 3 Graf znázorňuje hodnoty plochy jedné molekuly jednotlivých lipidových směsí při povrchovém tlaku 1,5 mN/m. Symbol * značí statisticky významný rozdíl oproti hodnotě, která byla naměřena u směsi se zastoupením LysoSph 0 %.

Graf 2 zobrazuje plochu, kterou v monovrstvě zaujímá jedna molekula lipidů příslušné směsi při povrchovém tlaku 20 mN/m (A_{20}). S rostoucím zastoupením LysoSph klesá velikost plochy jedné molekuly, s výjimkou směsi, která obsahuje 5 % LysoSph. Molekuly této směsi zaujímají větší plochu, než bychom podle trendu očekávali. Nejmenší plochu zaujímají molekuly směsi se 75% obsahem LysoSph ($A_{20} = 27,5 \text{ Å}^2$). Největší plocha byla zaznamenána u molekul směsi s nulovým obsahem LysoSph ($A_{20} = 34,2 \text{ Å}^2$). Statisticky významnou odchylku oproti směsi bez LysoSph vykazují směsi s obsahem LysoSph 2,5, 10, 25, 50 a 75 %. A_{20} byla u lipidové směsi bez obsahu LysoSph měřena v již dříve provedené studii, kde dosahovala hodnoty přibližně 40 Å^2 .³¹ Obě měření byla provedena za téže teploty ovšem s použitím odlišné subfáze.³¹ Jelikož složení subfáze ovlivňuje chování monovrstvy, rozdíl v hodnotách A_{20} této lipidové směsi může být zapříčiněn použitím odlišné subfáze.³⁴

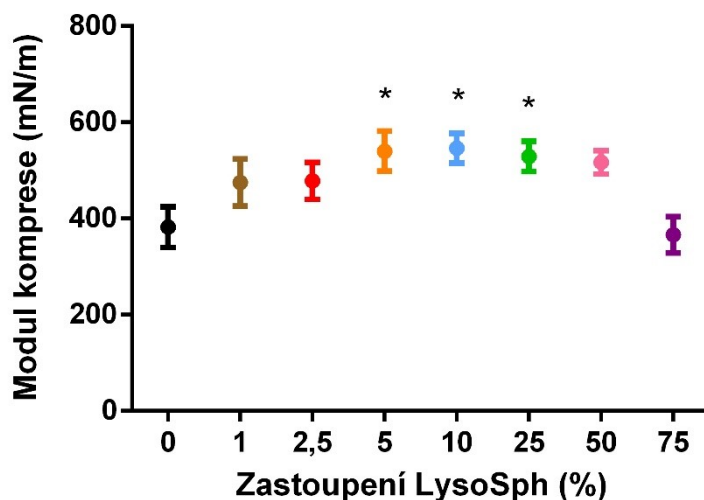
Podobné chování směsí bylo pozorováno při měření plochy jedné molekuly za povrchového tlaku 1,5 mN/m ($A_{1,5}$). Hodnoty ploch jedné molekuly jsou znázorněny v grafu 3. Obdobně jako při povrchovém tlaku 20 mN/m s rostoucím zastoupením LysoSph klesá velikost plochy jedné molekuly s tím rozdílem, že nejnižší hodnotu plochy jedné molekuly vykazuje směs s 50% zastoupením LysoSph ($A_{1,5} = 30,5 \text{ Å}^2$).

Nejvyšší hodnota byla naměřena u směsi s nulovým obsahem LysoSph ($A_{20} = 38,2 \text{ \AA}^2$). Statisticky významnou odchylku oproti směsi bez LysoSph vykazují tytéž směsi jako při povrchovém tlaku 20 mN/m . Směs s 5% zastoupením LysoSph vybočuje z trendu obdobným způsobem jako při povrchovém tlaku 20 mN/m .

Důvod, proč se v obou případech směs s 5% zastoupením LysoSph vymyká, není zcela jasný. Pravděpodobně při této koncentraci LysoSph dochází k interakcím molekul směsi mezi sebou, případně s molekulami subfáze.

Nízká hodnota plochy jedné molekuly při tlaku $1,5 \text{ mN/m}$ nasvědčuje vyšší ochotě k těsnějšímu uspořádání molekul.³⁵ Domnívali jsme se, že glukosa vázaná v molekule LysoSph by mohla stericky znemožňovat těsnější uspořádání molekul. Předpokládali jsme, že nižší hodnotu plochy jedné molekuly budou zaujímat lipidy ve směsi bez obsahu LysoSph. Výsledky ovšem poukazují na to, že nižší plochu jedné molekuly, a tedy i těsnější uspořádání molekul, mají lipidy ve směsích s vysokým zastoupením LysoSph. Domněnka, že glukosa stericky brání těsnějšímu uspořádání, nebyla potvrzena ani v dříve provedené studii zkoumající vliv GCer na uspořádání lipidových monovrstvy. Z jejích výsledků plyne, že s přidavkem GCer na úkor Cer (25-100 %) klesá hodnota A_{20} , a uspořádání molekul se tedy zdá těsnější.³² Příčinou jsou pravděpodobně interakce polárních částí molekul monovrstvy. Je známo, že Cer interagují s ostatními molekulami lipidů SC prostřednictvím vodíkových vazeb.³⁶ Předpokládá se, že tyto vazby jsou příčinou významné soudržnosti lipidové hmoty SC.³⁶ Ačkoli zastoupení Cer ve směsích klesá, zdá se, že soudržnost monovrstvy narůstá. LysoSph pravděpodobně také interaguje s molekulami lipidů SC prostřednictvím vodíkových vazeb, a to zřejmě ve větší míře než Cer.

5.2 Modul kompresibility



Graf 4 Graf znázorňuje hodnoty modulu kompresibility jednotlivých směsí. Symbol * značí statisticky významný rozdíl oproti hodnotě, která byla naměřena u směsi se zastoupením LysoSph 0 %.

Modul kompresibility (C_{\max}) představuje převrácenou hodnotu kompresibility (C_s). Hodnota kompresibility se počítá podle vztahu $C_s = (-1/A)/(dA/d\pi)$. A je teoretická plocha jedné molekuly a π je povrchový tlak. Těsnější uspořádání molekul v monovrstvě znemožňuje její další stlačování. Platí, že při těsnějším uspořádání molekul dosahuje modul kompresibility vyšších hodnot oproti volnějšímu uspořádání. Modul kompresibility je ukazatelem míry stlačitelnosti monovrstvy, tedy její elasticity. Čím vyšší je hodnota modulu kompresibility, tím je monovrstva méně elastická.²⁵

S nárůstem zastoupení LysoSph od 0 do 10 % dochází nejprve k nárůstu hodnot modulu kompresibility. Maximum modulu kompresibility, které naznačuje největší těsnost molekul v monovrstvě, bylo zjištěno u směsi s 10% zastoupením LysoSph ($C_{\max} = 546$ mN/m). Při vyšším obsahu LysoSph pak hodnoty modulu kompresibility klesají. Nejnížší hodnota modulu kompresibility byla naměřena u směsi s obsahem LysoSph 75 % ($C_{\max} = 366$ mN/m). Směs bez obsahu LysoSph vykazovala

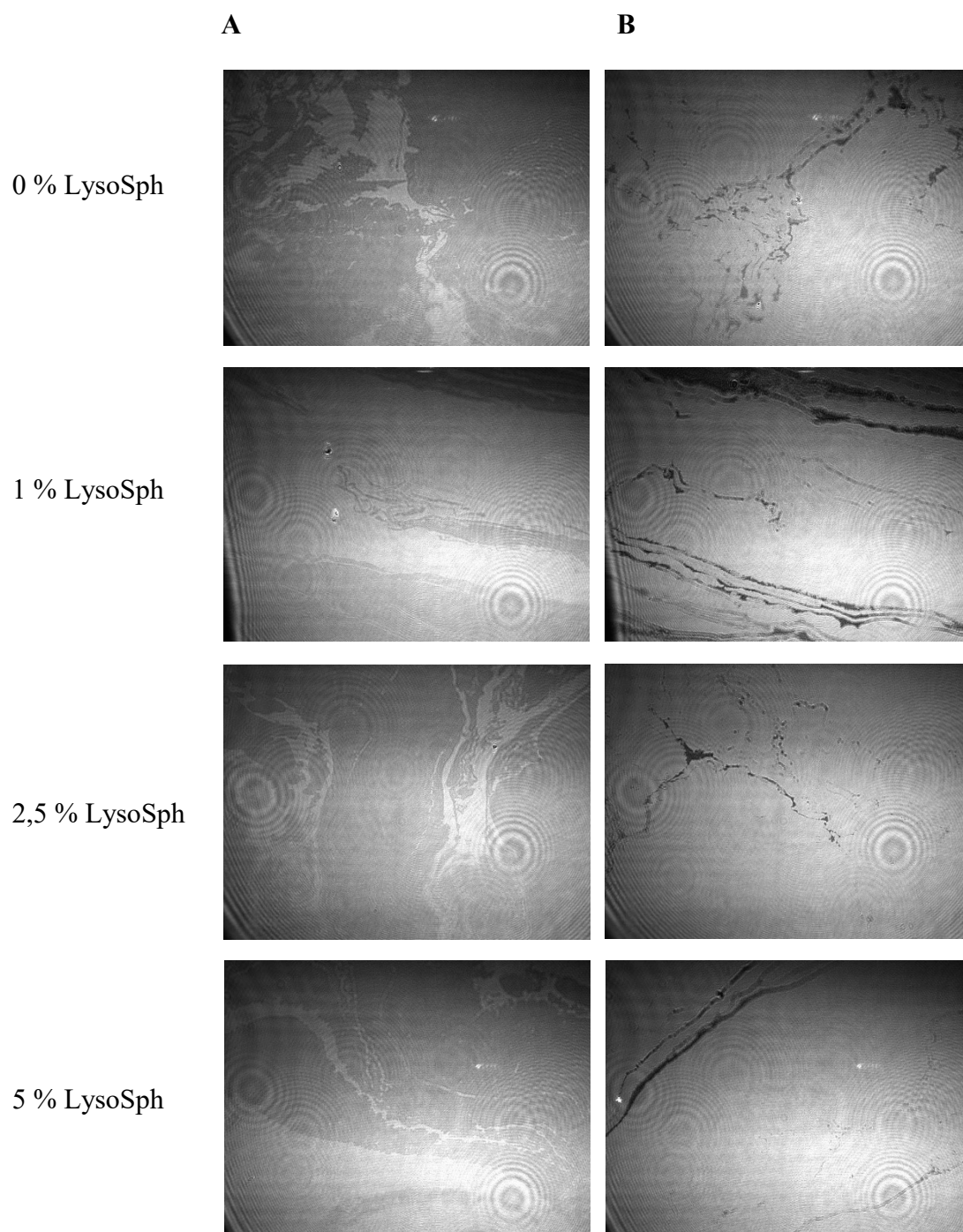
$C_{\max} = 382 \text{ mN/m}$. Modul kompresibility této směsi ovšem bez přítomnosti CholS byl měřen již v dříve provedené studii, kde $C_{\max} = 240 \text{ mN/m}$.³² Obě měření byla provedena za téže teploty ovšem s použitím odlišné subfáze.³² Jako subfáze byl u dříve provedené studie použit fosfátový pufr o koncentraci 10 mM a pH 7,4.³² Odlišnosti ve složení lipidové směsi i subfáze mohou být příčinou rozdílnosti hodnot.³⁴ I drobné změny v koncentraci příbuzných sterolových molekul, tj. Chol a CholS, mají dopad na organizaci lipidů SC v modelech kůže.³⁶ Výsledky měření naznačují, že směsi obsahující současně Cer i LysoSph (5, 10 a 25 % LysoSph) jsou významně méně pružné než směs obsahující pouze Cer. Rigidita směsí je ovlivňována nejen množstvím Cer a LysoSph ve směsi, ale i zastoupením VMK. Bylo zjištěno, že směsi lipidů SC se zastoupením VMK vykazují v monovrstevných modelech vyšší rigiditu než směsi bez VMK.³⁷ Zvýšená rigidita u směsí s obsahem LysoSph 5, 10 a 25 % by tedy mohla být zapříčiněna mimo jiné nárůstem obsahu VMK.

5.3 Hodnocení monovrstev pomocí Brewsterovy úhlové mikroskopie

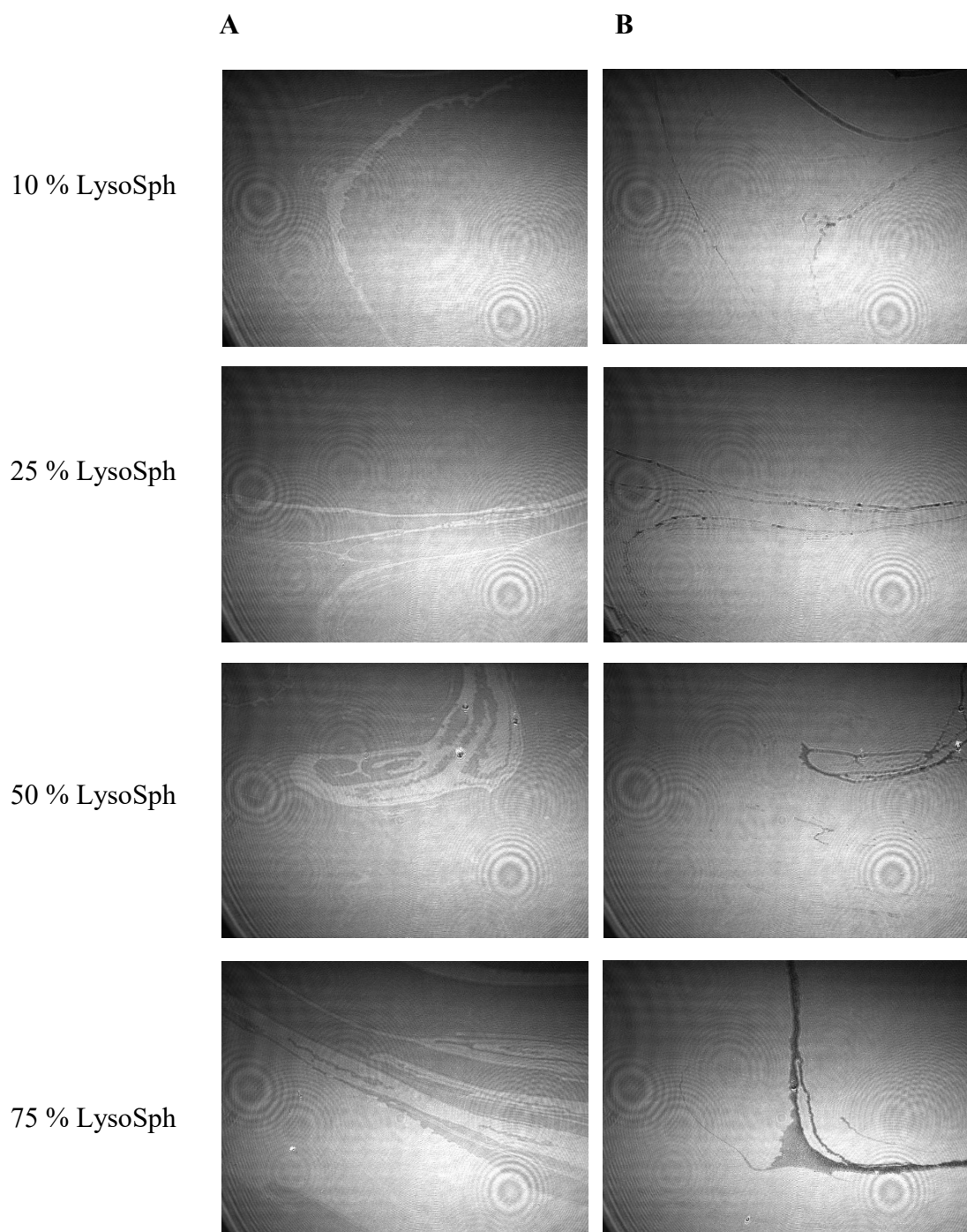
Na *obrázcích 12 a 13* jsou zobrazeny snímky pořízené pomocí Brewsterova úhlového mikroskopu. Při tlaku 2 mN/m jsou u všech směsí rozeznatelné lipidové domény, jakožto jasnější oblasti. Jsou poměrně volně uspořádány z důvodu nízkého stupně komprese. Jejich tvar není zcela jednotný pro všechny směsi. Domény směsí s menším zastoupením LysoSph (tzn. 0 - 5 %) se zdají být více nepravidelné a rozptýlené. Domény směsí s vyšším zastoupením LysoSph (tzn. 10, 25, 50 a 75 %) jsou uspořádány do pásů o různé šíři. Rozdíly ve tvaru domén jsou patrně způsobeny přítomností polárního LysoSph, neboť literatura uvádí, že na základě dipólových interakcí polárních molekul se domény uspořádávají do dlouhých úzkých tvarů.³⁸

Vlivem komprese dochází k přibližování molekul a formování těsnějších domén. Na snímcích pořízených při povrchovém tlaku 40 mN/m jsou dobře viditelné plochy monovrstev, které zabírají většinu snímku. Tmavé útvary znázorňují mezery mezi jednotlivými monovrstevnými doménami. Tyto mezery se zdají být širší u domén, které tvoří směs lipidů s 75% obsahem LysoSph.

Pokračující růst povrchového tlaku vede ke zhuštění uspořádání molekul v doménách a zvlnění monovrstvy kolmo ke směru komprese. Další růst tlaku způsobí překlopení monovrstvy za vzniku vícevrstevného útvaru.^{39, 40} Tyto útvary by se na snímcích zobrazily jako velmi světlé struktury. Tyto struktury nejsou na snímcích viditelné, neboť nebylo dosaženo dostatečně vysokého povrchového tlaku a k překlopení nedošlo.



Obr. 12 Snímky monovrstev pořízené Brewsterovým úhlovým mikroskopem. Sloupec **A** zobrazuje monovrstvy při povrchovém tlaku 2 mN/m. Sloupec **B** zobrazuje monovrstvy při povrchovém tlaku 40 mN/m.



Obr. 13 Snímky monovrstev pořízené Brewsterovým úhlovým mikroskopem. Sloupec **A** zobrazuje monovrstvy při povrchovém tlaku 2 mN/m. Sloupec **B** zobrazuje monovrstvy při povrchovém tlaku 40 mN/m.

5.4 Mikroskopie atomárních sil

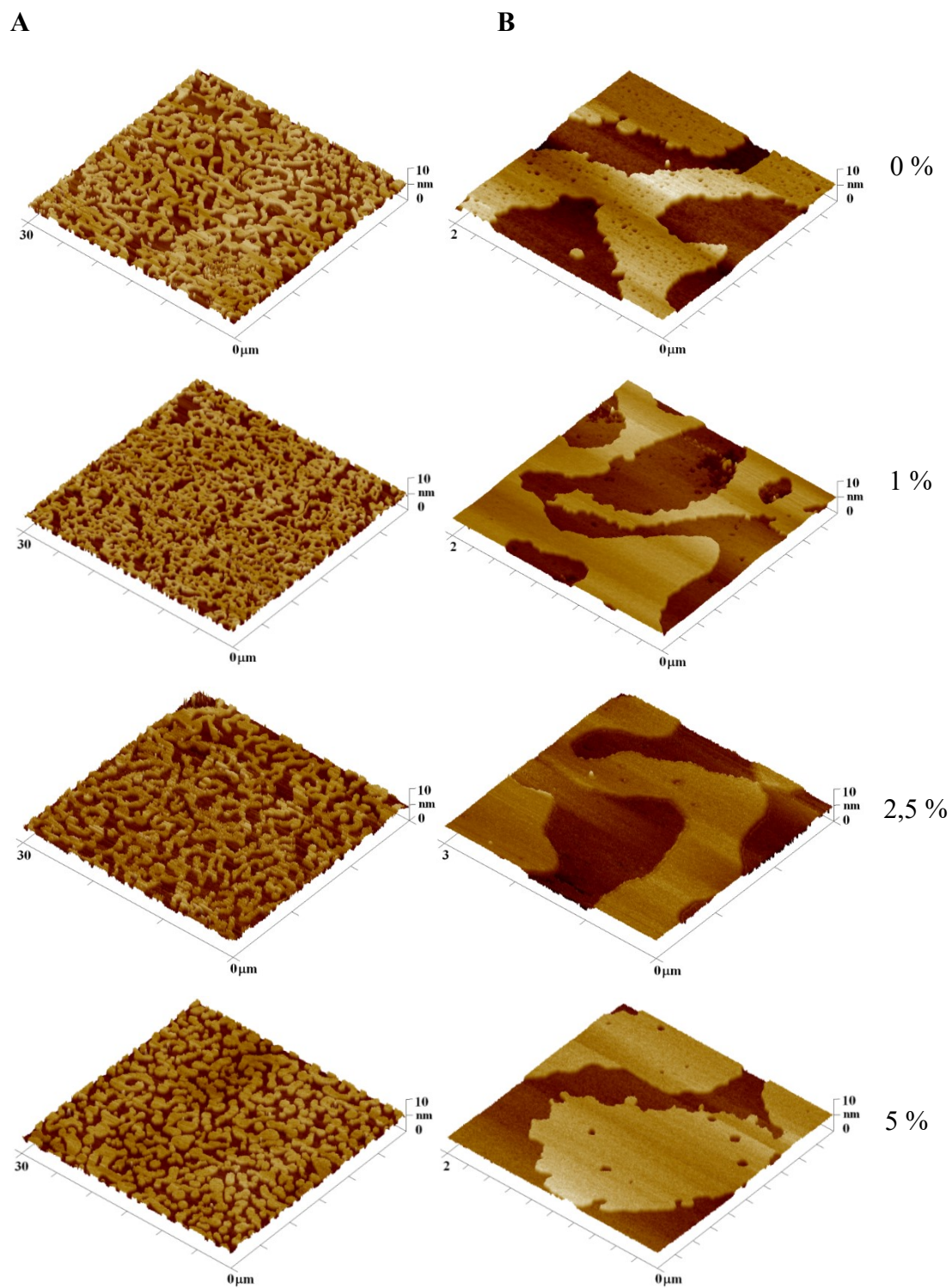
Struktura lipidových monovrstev na pevném podkladu byla studována pomocí mikroskopie atomárních sil. Detailní uspořádání jednotlivých lipidových směsí je zobrazeno na *obrázcích 14 a 15*.

Jasnější plochy vystupující nad povrch představují lipidové domény tvořené především Cer a VMK.³⁵ Lipidové směsi se zastoupením LysoSph 0, 1, 2,5, 10 a 25 % tvoří domény, které svou strukturou připomínají při zvětšení 30×30 μm jemné řetízky. Obdobné uspořádání bylo pozorováno v dříve provedených studiích u lipidových směsí s ekvimolárním zastoupením Cer, Chol a VMK.³⁵ Směs s 5% zastoupením LysoSph utváří ostrůvkovité domény. Domény směsí s vysokým obsahem LysoSph (50 a 75%) jsou znatelně roztržité.

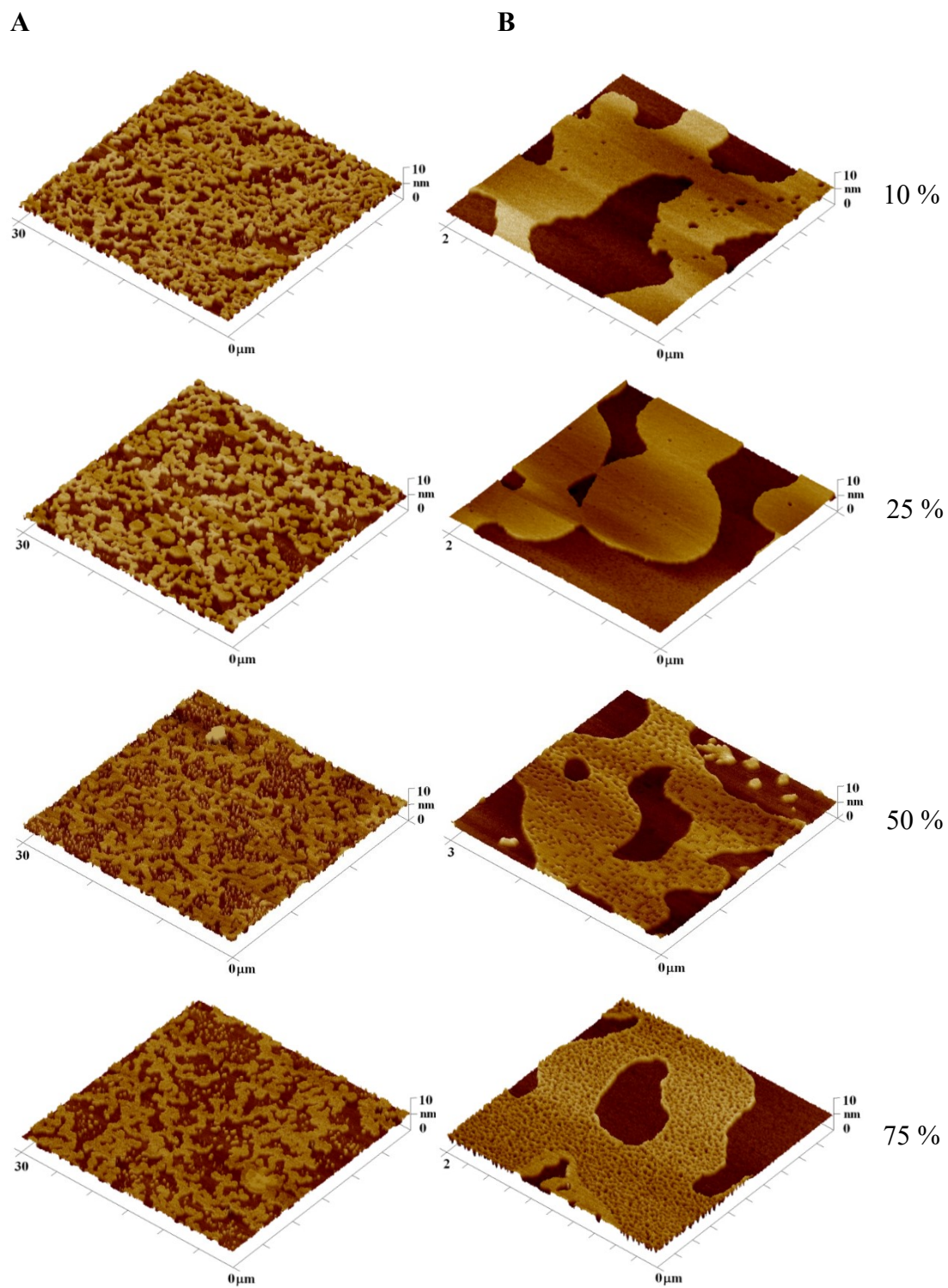
Bylo zjištěno, že přidavek Chol a CholS ke směsi Cer zapříčiňuje rozptýlení a zmenšení domén. VMK mají schopnost tento účinek Chol významně tlumit. S rostoucím zastoupením VMK ve směsi roste velikost domén a schopnost spolu splývat.⁴¹

Ve směsích zkoumaných v této práci postupně stoupá obsah VMK na úkor Cer. Očekávali bychom tedy, že se zvyšujícím se zastoupením VMK bude narůstat plocha jednotlivých domén a budou snadno splývat. Tato domněnka se nepotvrdila, zvětšování domén nebylo pozorováno ani u směsi s nejvyšším zastoupením VMK. Efekt VMK byl s největší pravděpodobností utlumen přítomností LysoSph.

Při zvětšení 2×2 μm (popřípadě 3×3 μm) je možné pozorovat změny ve struktuře domén. U směsí s obsahem LysoSph 50 a 75 % je jasně rozeznatelná přítomnost velkého počtu otvorů v doménách. Vysoké zastoupení LysoSph ve směsi tedy způsobuje snížení homogenity monovrstvy.



Obr. 14 Snímky monovrstev pořízené pomocí mikroskopie atomárních sil při zvětšení $30 \times 30 \mu\text{m}$ (sloupec **A**) a $2 \times 2 \mu\text{m}$, případně $3 \times 3 \mu\text{m}$ (sloupec **B**).



Obr. 15 Snímky monovrstev pořízené pomocí mikroskopie atomárních sil při zvětšení $30 \times 30 \mu\text{m}$ (sloupec **A**) a $2 \times 2 \mu\text{m}$, případně $3 \times 3 \mu\text{m}$ (sloupec **B**).

6 Závěr

V této práci byl prozkoumán vliv LysoSph na strukturu a vlastnosti lipidů SC v monovrstevném modelu. Bylo zjištěno, že růst zastoupení LysoSph způsobuje těsnější uspořádání molekul v monovrstevném modelu na rozhraní vzduch-kapalina. Směsi, u nichž byl Cer z 5, 10 a 25 % nahrazen LysoSph, vykazují významně nižší stlačitelnost, tudíž větší rigiditu. Vysoké zastoupení LysoSph ve směsi způsobuje změnu ve struktuře monovrstvy na pevném podkladu, která se zdá být roztržitější a méně kompaktní.

Směs, u níž bylo 5 % Cer nahrazeno LysoSph, vybočuje z trendů, které byly pozorovány. Bylo by žádoucí zopakovat pozorování právě této lipidové směsi. Zajímavé výsledky by jistě přineslo studium lipidových směsí s obsahem LysoSph na vícevrstevných modelech.

7 Literatura

¹ PETROVICKÝ, P. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi: III. svazek.*

Martin: Osveta, 2002. ISBN 80-8063-048-8.

² VÁVROVÁ, K., HRABÁLEK, A. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství.*

2006, **2**(2), 55-58.

³ KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie.* Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-

247-3068-4.

⁴ Anatomie lidské kůže. In: *Hojení-ran.cz* [online]. Praha: Meditorial, ©2017 [cit.

2017-04-15]. Dostupné z: <http://www.hojeni-ran.cz/anatomie-lidske-kuze>.

⁵ FEINGOLD, K. R., ELIAS P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids.*

2014, **1841**(3), 280-294.

⁶ VAN SMEDEN, J., JANSSENS, M., GOORIS, G. S., BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids.*

2014, **1841**(3), 295-313.

⁷ MIZUTANI, Y., MITSUTAKE S., TSUJI, K., KIHARA A., IGARASHI, Y.: Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie.*

2009, **91**(6), 784–790.

⁸ ZÁHEJSKÝ, J. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: Pohledy klinické, fyziologické a biologické.* Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1551-1.

⁹ RABIONET, M., GORGAS, K., SANDHOFF, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids.*

2014, **1841**(3), 422-434.

¹⁰ KOLTER, T. A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids.*

2011, **164**(6), 590-606.

-
- ¹¹ HOLLERAN, W. M., TAKAGI, Y., UCHIDA, Y. Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Letters*. 2006, **580**(23), 5456-5466.
- ¹² MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.). Jinočany: H & H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- ¹³ IMOKAWA, G. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: Expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Journal of Dermatological Science*. 2009, **55**(1), 1-9.
- ¹⁴ COANT, N., SAKAMOTO, W., MAO, C., HANNUN, Y. A. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation*. 2017, **63**, 122-131.
- ¹⁵ SCHUCHMAN, E.H. Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *BBA-Molecular Basis of Disease*. 2016, **1862**(9), 1459-1471.
- ¹⁶ OUAIRY, C.M.J., FERRAZ, M.J., BOOT, R.G., et al. Development of an acid ceramidase activity-based probe. *Chemical Communications*. 2015, **51**(28), 6161-6163.
- ¹⁷ SANDS, M.S. Farber disease: understanding a fatal childhood disorder and dissecting ceramide biology. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 2013, **5**(6), 799-801 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://doi.org/10.1002/emmm.201302781>
- ¹⁸ SCHULZE, H. a K. SANDHOFF. Sphingolipids and lysosomal pathologies. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(5), 799-810.

-
- ¹⁹ KOSTIK, M. M., CHIKOVA, I. A., AVRAMENKO, V. V., VASYAKINA, L. I., TRIONNAIRE, E., CHASNYK V. G., LEVADE, T. Farber lipogranulomatosis with predominant joint involvement mimicking juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013, **36**(6), 1079.
- ²⁰ BARNES, G. T., GENTLE, I. R. *Interfacial Science: An Introduction*. 2. New York: Oxford University Press, 2011. ISBN 978-0-19-957118-5.
- ²¹ GINER-CASARES, J. J., BREZESINSKI, G., MÖHWALD, H. Langmuir monolayers as unique physical models. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014, **19**(3), 176-182.
- ²² GUNSTONE, F. D., HARDWOOD, J. L., PADLEY, F. B. *The Lipid Handbook, Second Edition*. 2. London: Chapman and Hall, 1994. ISBN 0-412-43320-6.
- ²³ Langmuir, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Technologies. *Biolin Scientific* [online]. Biolin Scientific Holding AB, 2016 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies/>
- ²⁴ Organized ultrathin films of organic and organic-inorganic hybrid materials for chemical sensors. *Group of molecular films research (W. Kutner)* [online]. ICHF, 2015 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://groups.ichf.edu.pl/kutner/research/view?id=25&name=Organized+ultrathin+films+of+organic+and+organic-inorganic+hybrid+materials+for+chemical+sensors>
- ²⁵ MCINTOSH, T. J. *Lipid Rafts*. 1. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007. ISBN 978-1-58829-729-7.
- ²⁶ VOLLHARDT, D. Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014, **19**(3), 183-197.
- ²⁷ Brewster Angle Microscopy. *Biolin Scientific* [online]. Biolin Scientific Holding AB, 2016 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies/>

²⁸ Mikroskopie atomárních sil. *Nanometrologie.cz* [online]. CMI, 2012 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: http://www.nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php

²⁹ GROEN, D., GOORIS, G. S., BOUWSTRA, J. A. Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a unique lamellar phase. *Langmuir*. 2010, **26**(6), 4168-75.

³⁰ Brewster Angle Microscope. *Biolin Scientific* [online]. Biolin Scientific Holding AB, 2016 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/products/>

³¹ ŠKOLOVÁ B., JANŮŠOVÁ B., ZBYTOVSKÁ J., GOORIS G., BOUWSTRA J., SLEPIČKA P., BERKA P., ROH J., PALÁT K., HRABÁLEK A., VÁVROVÁ K. Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir*. 2013, **29**(50), 15624-33.

³² NOVÁČKOVÁ, Anna. Studium poruch kožní bariéry pomocí lipidových monovrstev. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

³³ FERRAZ, M. J., MARQUES, A. R. A., GASPAR, P., et al. Lyso-glycosphingolipid abnormalities in different murine models of lysosomal storage disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2016, **117**(2), 186-193.

³⁴ What and why: Langmuir films. *Biolin Scientific* [online]. Biolin Scientific Holding AB, 2016 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/zafepress.php?url=%2Fpdf%2FKSV%20NIMA%2FTheory%20Notes%2FKN-TN-01-Langmuir-films.pdf>

³⁵ SPARR, E., ERIKSSON, L., BOUWSTRA, J. A., EKElund, K. AFM Study of Lipid Monolayers: III. Phase Behavior of Ceramides, Cholesterol and Fatty Acids. *Langmuir*. 2001, **17**(1), 164-172.

-
- ³⁶ Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *J Phys Chem B*. 2000, **104**(9), 2159-2165.
- ³⁷ Ten Grotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; vanMiltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A., Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophysical Journal*. 1996, **71**(3), 1389-1399.
- ³⁸ SEUL, M., ANDELMAN, D. Domain Shapes and Patterns: The Phenomenology of Modulated Phases. *Science*. 1995, **267**(5197), 476-483.
- ³⁹ LÓPEZ-MONTERO, I., CATAPANO, E. R., ESPINOSA, G., ARRIAGA, L. R., LANGEVIN D a MONROY F. Shear and compression rheology of Langmuir monolayers of natural ceramides: solid character and plasticity. *Langmuir*. 2013, **29**(22), 6634-44.
- ⁴⁰ CATAPANO, E. R., ARRIAGA, L. R., ESPINOSA, G., MONROY, F., LANGEVIN, D., LÓPEZ-MONTERO, I. Solid Character of Membrane Ceramides: A Surface Rheology Study of Their Mixtures with Sphingomyelin. *Biophysical Journal*. 2011, **101**(11), 2721-2730.
- ⁴¹ NORLÉN, L., GIL, I. P., SIMONSEN, A., DESCOUTS, P. Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir – Blodgett films. *Journal of Structural Biology*. 2007, **158**(3), 386-400.